

УДК 576.775:577.811/.812

**ВЛИЯНИЕ ИСХОДНОЙ ЗАРАЖЕННОСТИ
ЧУМНЫМ МИКРОБОМ БЛОХ *CITELLOPHILUS TESQUORUM
ALTAICUS* (SIPHONAPTERA: CERATOPHYLLIDAE)
НА ИХ АЛИМЕНТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ, СМЕРТНОСТЬ
И ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ**

© Е. Г. Токмакова,* Л. П. Базанова, Г. А. Воронова

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора,
ул. Трилиссера, 78, Иркутск, 664047

* E-mail: flea98@mail.ru

Поступила 06.02.2018

Проведено экспериментальное исследование жизнеспособности блох *Citellophilus tesquorum altaicus* (Ioff, 1936) при различной исходной зараженности их возбудителем чумы. Установлено, что *Yersinia pestis* стимулирует алиментарную активность блох при питании на неспецифическом прокормителе. Различия в смертности зараженных и незараженных имаго не выявлены. Показаны половые различия во взаимоотношениях блох с возбудителем чумы.

Ключевые слова: *Citellophilus tesquorum altaicus*, *Yersinia pestis*, исходная зараженность, алиментарная активность, смертность, биопленка, половые различия.

Преимущественная роль блох как переносчиков чумного микроба обусловлена наличием у этих насекомых особого механизма передачи. Способность чумного микроба к образованию биопленки проявляется в организме блох в виде «блока» преджелудка, что обеспечивает реализацию трансмиссии возбудителя. Известно, что «блокированная» блоха фактически лишена возможности поглощать пищу, поэтому она значительно чаще нападает на своих хозяев — прокормителей, чем незараженная. Однако в работах, посвященных взаимоотношениям *Yersinia pestis* и блох, нет указаний на особенности в пищевом поведении зараженных неблокированных переносчиков, как при отдельном рассмотрении, так и в связи с накоплением в них агрегированных форм возбудителя.

Цель настоящей работы — оценить влияние исходной зараженности *Citellophilus tesquorum altaicus* на алиментарную активность, смертность блох и динамику формирования биопленки (конгломератов) *Y. pestis* в их организме.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Эксперименты проведены на базе ФКУЗ Иркутский противочумный институт с инсектарной культурой блох *C. tenuiorum altaicus*, начало которой положили насекомые из Тувинского природного очага. В опыт брали молодых блох, которых оставляли с прокормителем (золотистым хомячком) на 2—3 дня после выплода, а затем отсаживали и содержали голодными 5—7 дней. Две группы эктопаразитов инфицировали искусственно на биомемbrane референтным для этого очага штаммом чумного микроба И-2638, имеющим 4 плазиды (рYT, рYV, рYP, рTP33). Заражающая смесь состояла из 2 млрд суспензии двухсуточной агаровой культуры, выращенной при 28 °C, и дефибринированной крови морской свинки в равных объемах. Исходную зараженность определяли, как приводится в аналогичных опытах (Хрущевская, 1967; Бибикова, 1968; Елкин, Осипова, 1970; Хрущевская, Сержанов, 1974; Ващенок и др., 1992), бактериологическим исследованием 10 блох из каждой группы. В первой группе насекомых она составила 50 %, что, учитывая небольшое количество напившихся блох (56 самок и 25 самцов), не могло считаться удовлетворительным началом опыта. Поэтому была заражена вторая группа, в которой чумной микроб обнаружен при посеве всех исследованных насекомых — по 5 особей того и другого пола (100 %). При этом наблюдения за первой группой продолжили. В качестве контроля использовали группу неинфицированных имаго. Блох подкармливали через 2—3 сут в течение 3 ч на беспородных белых мышах. Между подкормками их содержали в предварительно простерилизованном песке при температуре 18—20 °C и относительной влажности 87—90 %. Всего в ноябре—декабре осуществлено по 8 подкормок инфицированных и неинфицированных эктопаразитов, использовано 347 имаго (226 ♀ и 121 ♂). После подкормок учитывали число особей с бактериальными «глыбками», полными и частичными блоками за одну подкормку. Алиментарную активность насекомых определяли по доле пивших от числа живых за подкормку, а смертность — по доле мертвых имаго от общего их количества за весь период опыта и при каждой подкормке. Статистическую обработку провели общепринятыми методами (Рокицкий, 1973) с применением программы «Excel». Использовали критерий Стьюдента; влияние различных факторов (степень зараженности, пол блох) на изучаемые показатели оценивали с помощью одно- и двухфакторного дисперсионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физиологические функции организма переносчика обеспечивают необходимые условия для роста и размножения в нем бактерий чумы, поэтому такие показатели, как алиментарная активность и смертность, являются необходимыми при анализе экспериментов с блохами и чумным микробом.

Рассмотрим сначала активность питания в контрольной группе эктопаразитов, потому что отсутствие возбудителя позволяет оценить влияние других факторов — прежде всего срока подкормок. С V по VIII подкормки

Таблица 1

Алиментарная активность самок и самцов *Citellophilus tesquorum altaicus* в опыте, %Table 1. Alimentary activity of *Citellophilus tesquorum altaicus* females and males in the experiment, %

Подкормка	Исходная зараженность	Самки			Самцы		
		0 %, контроль	50 %	100 %	0 %, контроль	50 %	100 %
I	76.67	95.83	87.38	87.18	94.44	90.91	
II	83.93	88.37	85.11	78.38	94.12	93.18	
III	71.70	90.48	100.00	87.50	100.00	100.00	
IV	77.55	92.68	98.89	82.14	100.00	100.00	
Среднее за I—IV подкормки	77.5 ± 2.51	91.8 ± 1.60	92.8 ± 3.85	83.8 ± 2.18	97.1 ± 1.65	96.0 ± 2.34	
V	100.00	85.37	94.19	100.00	88.89	100.00	
VI	95.56	97.50	98.80	82.61	100.00	100.00	
VII	93.18	97.30	97.44	95.00	100.00	100.00	
VIII	97.62	100.00	98.63	93.75	100.00	100.00	
Среднее за V—VIII подкормки	96.6 ± 1.45	95.0 ± 3.28	97.3 ± 1.07	92.8 ± 3.67	97.2 ± 2.78	100 ± 0.00	
Среднее за опыт	87.0 ± 3.86	93.4 ± 1.79	95.1 ± 2.03	88.3 ± 2.61	97.2 ± 1.50	98.0 ± 1.32	

как самки, так и самцы блох питались чаще, чем с I по IV. Более того, доли питавшихся самок за эти периоды представляют собой два неперекрывающихся интервала (табл. 1). В двухфакторном дисперсионном анализе установлено влияние на алиментарную активность сроков подкормок ($F = 29.78$; $P < 0.001$), но не пола незараженных блох ($F = 0.25$; $P > 0.05$). Взаимодействие указанных факторов не определилось ($F = 3.82$; $P > 0.05$). По нашему мнению, здесь имеет место адаптация блох к питанию на неспецифическом прокормителе. В природе *C. tesquorum* — паразиты сусликов, лабораторная популяция поддерживается на золотистых хомячках, смесь для заражающего кормления готовилась на основе крови морской свинки, затем насекомые питались на белых мышах. Самки блох в проведенном опыте более резко отреагировали на смену прокормителя, чем самцы. К концу опыта в живых остались особи, регулярно пившие кровь белых мышей, т. е. менее прихотливые. Известно существование индивидуальных предпочтений у блох в выборе прокормителя (Белокопытова, 1984) вплоть до полной непереносимости (Золотова и др., 1971). Большую по сравнению с самцами приверженность самок *C. tesquorum* к специальному хозяину мы отмечали ранее в специальном исследовании (Базанова и др., 2012).

У инфицированных блох, независимо от срока подкормок, половых особенностей и исходной зараженности, в течение всего опыта наблюдали одинаково высокую активность кровососания (табл. 1). Причем, если по-

ле I—IV подкормок инфицированные блохи пили чаще контрольных, то после V—VIII подкормок различий между ними не отметили. У самок, учитывая контрольную группу, выявлено достоверное влияние на алиментарную активность срока подкормок ($F = 18.99$; $P < 0.001$), вероятное — исходной зараженности ($F = 5.74$; $P < 0.05$) и значительное — взаимодействия этих факторов ($F = 6.26$; $P < 0.01$). У самцов, наоборот, самым мощным фактором, определяющим активность кровососания, оказалась исходная зараженность ($F = 10.14$; $P < 0.01$) независимо от срока подкормок (взаимодействие $F = 1.77$; $P > 0.05$), вклад последнего менее выражен ($F = 5.02$; $P < 0.05$). То есть присутствие возбудителя побуждало переносчика к питанию на использованном в опыте зверьке. У самцов *C. tenuiquum* это происходило в течение всего опыта, у самок — в его первой половине. Поскольку предполагаемый процесс «привыкания» к белой мыши как новому виду прокормителя происходит как у зараженных, так и у незараженных блох, одинаковый уровень алиментарной активности в группах самок эктопаразитов во второй половине опыта свидетельствует о прекращении или хотя бы ослаблении влияния присутствия чумного микробы на питание самок. В итоге в живых остаются самки, способные более эффективно перестроиться на новый источник пищи.

По результатам опыта в целом без учета срока подкормок выявлено достоверное влияние зараженности на количество пивших за подкормку блох ($F = 8.38$; $P < 0.001$), влияние их половых особенностей статистически не доказано ($F = 1.94$; $P > 0.05$). Вклад фактора «пол» в алиментарную активность, как показано нами ранее, непостоянен и определяется сезоном проведения опыта (Базанова и др., 2012). В экспериментах на кошачьей блохе обнаружено, что при питании кровью специфического прокормителя имаго с экскрементами выделяют 83—90 % белка крови практически в неизменном виде (Silverman, Appel, 1994). Позднее установлено, что из 78 метаболических генов *Y. pestis*, специфически активированных в кишке блохи, большинство участвуют в транспорте и поглощении аминокислот, из чего делается вывод, что именно аминокислоты являются для возбудителя чумы основными источниками углерода, азота и энергии (Vadyvaloo et al., 2010). Таким образом, повышенный «аппетит» зараженных насекомых не может являться следствием конкуренции за пищу со стороны чумного микробы и соответственно недоедания, а регулируется какими-то другими факторами.

В среднем за подкормку в контрольной группе погибало 4.7 ± 0.99 % самок и 10.6 ± 2.14 % самцов, в опытных — 4.3 ± 1.18 и 4.2 ± 1.01 % самок и 23.2 ± 6.82 и 10.7 ± 2.70 % самцов при 50 и 100 % исходной зараженности соответственно ($F = 2.47$; $P > 0.05$). Исходная зараженность не влияла на смертность блох. В противоположность обнаруженному для алиментарной активности самцы как инфицированные, так и интактные, погибали по сравнению с самками значительно чаще, влияние пола высокозначимо ($F = 15.91$; $P < 0.001$).

Доля блох с полным блоком преджелудка от взятых в опыт насекомых с 50%-ной зараженностью составила 2.82 %, среди особей со 100%-ной зараженностью — 3.90 % ($t = 0.43$; $P > 0.05$). Соотношение особей с частичным блоком в этих же группах составило 7.04 и 8.44 % ($t = 0.37$; $P > 0.05$; табл. 2). Таким образом, относительное количество насекомых как с пол-

Таблица 2

Количество *Citellophilus tesquorum altaicus* с полными и частичными блоками преджелудка

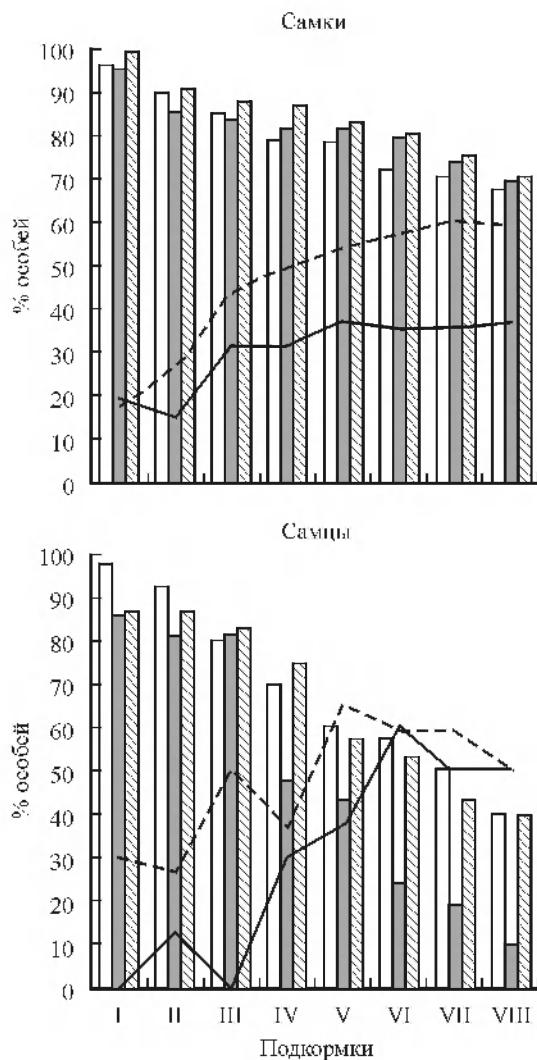
Table 2. The number of *Citellophilus tesquorum altaicus* with complete and partial proventriculus blocks

Исходная зара- женность блох, %	Самки						Самцы		
	Всего в опыте	Из них с блоками			Всего в опыте	Из них с блоками			
		с полным	с частич- ным	всего		с полным	с частич- ным	всего	
50	50	2	5	7	21	0	0	0	
100	103	5	13	18	51	1	0	1	

ными, так и с частичными блоками в сравниваемых выборках не различалось. Как неоднократно показано нами ранее (Базанова и др., 2004; Базанова и др., 2012), по мере приближения к зиме доля блокированных среди зараженных *C. tesquorum* обычно снижается. Можно предположить, что небольшое количество эктопаразитов с массивными формами биопленки обусловлено сроком инфицирования опытных групп.

Поскольку учет блох с полными и частичными блоками оказался неинформативен, для дальнейшего сравнения использовали среднюю долю насекомых с видимыми биопленками за подкормку того и другого пола в отдельности. Среди особей с 50%-ной зараженностью данный показатель составил $30.6 \pm 2.95\%$ у самок и $30.0 \pm 8.31\%$ у самцов. В группе со 100%-ной зараженностью соответственно 46.5 ± 5.73 и $47.2 \pm 5.10\%$. По результатам двухфакторного дисперсионного анализа, фактор «исходная зараженность» оказывал существенное влияние на формирование агрегированных форм чумного микроба ($F = 8.004$; $P < 0.001$), влияние фактора «пол» не установлено ($F = 0.0001$; $P > 0.05$).

В группах с различной исходной зараженностью в течение опыта среди живых и активных насекомых наблюдалось накопление особей, содержащих агрегаты возбудителя чумы (см. рисунок). К концу опыта количество таких самок стабилизировалось, достигнув к VI подкормке состояния «плато». Стоит отметить тот факт, что именно с VI подкормки в обеих группах сократилось до минимума и количество непивших самок, составляя от 0 до 2 особей. Очевидно, что самки с биопленками чумного микроба, напиваясь каждую подкормку, учитывались практически в полном составе. Более того, в обеих группах инфицированных блох большинство этих самок выявлялось, начиная с III подкормки: 12 особей при 50%-ной исходной зараженности и 40 при 100%-ной. В дальнейшем их абсолютное количество изменялось незначительно. В первой группе оптически плотные массы микроба наблюдали максимально у 14 самок, до конца опыта дожили 13. Во второй группе количество самок с биопленками возросло до 48, а после VIII подкормки отмечено 43 особи. Вероятно, при прочих равных условиях только определенная доля самок из всех зараженных способна стать резервуаром для возбудителя чумы, как это имеет место поздней осенью и зимой в Тувинском очаге (Вержуцкий и др., 2003). У за-



Выживание *Citellophilus tesquorum altaicus* в экспериментальных условиях и выявление среди них особей с биопленками *Yersinia pestis*.

Столбцы гистограммы — доля выживших при каждой подкормке блох от количества взятых в опыт (%), белые — исходная зараженность 0 % (контроль), серые — исходная зараженность 50 %, заштрихованные — исходная зараженность 100 %; кривые — доля насекомых с биопленками, сплошная линия — исходная зараженность 50 %, прерывистая — исходная зараженность 100 %.

Survival of *Citellophilus tesquorum altaicus* in experimental conditions and revealing of individuals with *Yersinia pestis* biofilms among them.

раженных самцов 100%-ную «напиваемость» регистрировали в обеих группах с III подкормки. Таким образом, скачкообразные изменения доли самцов с агрегатами микробы происходили за счет вымывания и образования последних, а также гибели экспериментальных насекомых.

Наблюдения за отмиранием инфицированных возбудителем чумы блох в сравнении с неинфицированными в работах разных исследователей не приводили к однозначным выводам. Точку в этом вопросе попытался по-

ставить Ващенок (1992), установивший зависимость между смертностью опытных блох *Callopsylla caspia* и способом их заражения: на животном с бактериемией, на биомемbrane культурой, выращенной при 37 или при 28 °C. В первых двух случаях смертность зараженных блох была выше, чем контрольных. Тем не менее в экспериментах, проведенных в Тувинском природном очаге с инфицированием *C. tesquorum* местными четырехплазмидными штаммами на длиннохвостых сусликах (Базанова и др., 2012), отмечена очень высокая выживаемость эктопаразитов. Все самки, взятые в опыт, оставались живыми до 8, а в некоторых случаях и до 13 сут. Контрольную группу тогда не вели, но 100%-ная выживаемость выше недели ожидаема скорее у незараженных насекомых. К 26—28 сут, что соответствует по срокам VIII последней подкормке описываемого здесь опыта, сохранились живыми 70—72 % самок. В то же время другие авторы приводят данные о повышенной гибели блох *Xenopsylla cheopis* после искусственного заражения дикими штаммами *Y. pestis*, предварительно выращенными при 26—28 °C, в сравнении с незараженными (Robinson et al., 2009). Вероятно, смертность инфицированных чумой блох, кроме способа заражения, определяется их видовой, вернее даже популяционной, принадлежностью, особенностями штаммов возбудителя и их взаимной адаптацией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Способность патогенов модулировать поведение переносчика в сторону увеличения его контакта с прокормителем и тем самым вероятности успешной передачи обнаружена у трипаносом птиц и комаров, лейшманий и москитов, трипаносом и мух цеце (Сергиев, 2010). Кроме того, на примере вируса клещевого энцефалита и клеща-переносчика показано, что увеличение агрессивности клещей — дозависимое явление: чем выше титр вируса в клеще, тем он двигательно активнее (Алексеев, Дубинина, 2007). Изменение поведения зараженных неблокированных блох по сравнению с незараженными отмечено впервые в эксперименте с *C. tesquorum*. В ранние сроки после заражения (до двух недель) инфицированные самки эктопаразитов питались значительно чаще контрольных. В дальнейшем (на 3—4-й неделях эксперимента) различия в доле напившихся за подкормку самок между насекомыми опытных и контрольной групп не обнаружены.

Большинство зарегистрированных у самок биопленок образовывались к III подкормке, после чего их количество изменилось незначительно, составляя примерно 60—70 % от исходно зараженных особей. По нашему мнению, активно растущая микроколония (биопленка) стимулирует потребность переносчика в кровососании. Напротив, сформировавшаяся биопленка минимизирует свое влияние на него. Применительно к естественным условиям это позволяет самкам, содержащим возбудителя чумы, перезимовать наравне со свободными от него. На фоне самок способность самцов переживать холодный сезон года слабая. Соответственно их отношения с чумным микробом в предзимний период имеют незавершенный характер. С одной стороны, на протяжении всего опыта после заражения

Y. pestis у них отмечается повышенная алиментарная активность, с другой, они не образуют компактной четко выраженной группы хранителей инфекции, как это имеет место у самок. Доля самок с «глыбками», свободно плавающими в желудке, к VIII подкормке составила в опытных группах 91.7 и 95.0 % от выявленных при III подкормке. Выживаемость контрольных самок за тот же период — 79.2 %. Исходя из приведенных нами данных, мы считаем преобладающее в настоящее время мнение о вредном влиянии возбудителя чумы на блох-переносчиков неоднозначным и неокончательным. Приведенные в данной работе результаты ни в коей мере не ставят под сомнение выводы других авторов и относятся только к *C. tesquorum* и *Y. pestis* из Тувинского очага чумы. Сложившиеся между ними взаимоотношения являются уникальными и нуждаются в дальнейшем изучении.

Список литературы

Алексеев А. Н., Дубинина Е. В. 2007. Вирус клещевого энцефалита во внутренней среде клеща-переносчика: экологические аспекты. Бюллетень Сибирского отделения РАНН. 126 (4): 100—104.

Базанова Л. П., Вержуцкий Д. Б., Токмакова Е. Г. 2012. Влияние прокормителя на частоту блокообразования у самок и самцов *Citellophilus tesquorum altaicus* Ioff, 1936 (Siphonaptera: Ceratophyllidae) и передачу ими чумного микроба. Паразитология. 46 (2): 91—97.

Базанова Л. П., Воронова Г. А., Токмакова Е. Г. 2004. Влияние сезонных особенностей и половых различий на передачу чумного микробы блохами *Citellophilus tesquorum altaicus* (Ioff, 1936) и эпизоотический процесс. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАНН. 2 (1): 28—34.

Белокопытова А. М. 1984. Предпочтение в выборе хозяина у блох *N. laeviceps* и *X. conformis* в эксперименте. В сб.: Таран И. Ф. (ред.). Особо опасные инфекции на Кавказе: Тезисы докладов 5 краевой научно-практической конференции, посвященной 50-летию образования противочумной службы Кавказа. Ставрополь: Ставропольская правда. 138—139.

Бибикова В. А. 1968. Взаимоотношения переносчика и возбудителя болезни при чуме. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Алма-Ата. 34 с.

Ващенок В. С., Дегтярева Л. В., Щедрин В. И. 1992. Влияние чумного микробы полевочьего подвида на жизнеспособность блох *Callopsylla caspia*. Паразитология. 26 (2): 105—113.

Вержуцкий Д. Б., Ткаченко В. А., Попов В. В., Колосов В. М. 2003. О сохранении возбудителя чумы в Тувинском природном очаге. Журнал инфекционной патологии. 10 (4): 31—32.

Елкин Ю. М., Оsipова С. П. Активность блох *Ceratophyllus caspius* как переносчиков чумы. В сб.: Пилипенко В. Г. (ред.). Особо опасные инфекции на Кавказе: Материалы II научной конференции противочумных учреждений Кавказа по эпидемиологии, эпизоотологии, профилактике особо опасных инфекций. Ставрополь. 1: 112—116.

Золотова С. И., Павлова А. Е., Якунин Б. М. 1971. Продолжительность жизни *Ri-lex irritans* при питании на неспецифическом хозяине. В сб.: Айкимбаев М. А. (ред.). Материалы VII научной конференции противочумных учреждений Средней Азии и Казахстана. Алма-Ата. 377—378.

Рокицкий П. Ф. 1973. Биологическая статистика. Минск: Вышэйшая школа. 320 с.

Сергиев В. П. 2010. Направленное управление паразитами поведением членистоно-гих — переносчиков. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2: 49—53.

Хрущевская Н. М. 1967. Вопросы изменчивости вирулентных свойств возбудителя чумы в организме блох и лабораторных животных. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Алма-Ата. 20 с.

Хрущевская Н. М., Сержанов О. С. 1974. Судьба возбудителя чумы в блохах, предварительно питавшихся на иммунных животных. В сб.: Айкимбаев М. А. (ред.). Материалы VIII научной конференции противочумных учреждений Средней Азии и Казахстана. Алма-Ата. 143—145.

Robinson J. B., Telepnev M. V., Zudina I. V., Bouyer D., Montenieri J. A., Bearden S. W., Gage K. L., Agar S. L., Foltz S. M., Chauhan S., Chopra A. K., Motin V. L. 2009. Evaluation of a *Yersinia pestis* mutant impaired in a thermoregulated type VI-like secretion system in flea, macrophage and murine models. *Microbial Pathogenesis*. 47: 243—251.

Silverman J., Appel A. G. 1994. Adult cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) excretion of host blood proteins in relation to larval nutrition. *Journal of Medical Entomology*. 31 (2): 265—271.

Vadyvaloo V., Jarrett C., Sturdevant D. E., Sebbane F., Hinnebusch B. J. 2010. Transit through the flea vector induces a pretransmission innate immunity resistance phenotype in *Yersinia pestis*. *PLOSpathogens*. 6 (2): e1000783. Режим доступа: <http://www.plospathogens.org> (1 февраля 2014).

EFFECT OF THE INITIAL *YERSINIA PESTIS*
 CONTAMINATION OF *CITELLOPHILUS TESQUORUM ALTAICUS* IOFF, 1936
 (SIPHONAPTERA: CERATOPHYLLIDAE) TO ITS ALIMENTARY ACTIVITY,
 MORTALITY AND BIOFILM FORMATION

E. G. Tokmakova, L. P. Bazanova, G. A. Voronova

Key words: *Citellophilus tesquorum altaicus*, *Yersinia pestis*, initial contamination, alimentary activity, mortality, biofilm, sexual differences.

SUMMARY

Alimentary activity and mortality of fleas non-infected with *Yersinia pestis* and ectoparasites with initial contamination level 50 and 100 % at feeding on non-specific host (white mouse) were examined. It was determined that presence of the plague agent in fleas significantly stimulated the activity of its feeding, especially in females. The effect of contamination to fleas' mortality was not found. At the same time, males died more frequently in comparison with females. Complete and partial blocks in ectoparasite groups with different initial infection rate were mainly observed in females; no quantitative differences were revealed. The total part of fleas with *Y. pestis* biofilms (blocks and «aggregations») per one blood meal depended significantly on the initial infection rate. Some females maintained the plague agent in aggregated form after the third blood meal to the end of the experiment. In flea males the biofilm formation was a dynamic process consisted of the formation, destruction and elution, and also death of the individuals with bacteria.